

# Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan.

## TRANSACTIONS

### Untersuchungen über den Kohlenhydratstoffwechsel im Zuckerrohr mit Hilfe der Pikrinsäuremethode.

Von T. YOSHIDA, B. WO, T. FUKUURA  
und K. YAMAFUJI.

(Aus dem Institut für Zuckerforschung in Tainan)

Eingegangen am 24. 4. 1941.

Bei den physiologischen Untersuchungen des Zuckerrohrs sind wir oft genötigt, eine grosse Anzahl Rohrstengel zugleich zu behandeln. Die Zuckerbestimmung muss in diesem Falle leicht und schnell ausgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit haben wir die colorimetrische Methode zur Zuckerbestimmung mit Pikrinsäure nach *Lewis-Benedict-Schachkeldian*<sup>(1)</sup> modifiziert und die modifizierte Methode auf die Untersuchungen über das Verhalten der Zuckerarten im Zuckerrohr angewandt.

#### 1. ZUR ZUCKERBESTIMMUNG MITTELS PIKRINSÄURE.

1 cc Glucoselösung wird in ein kleines Reagensglas eingetragen, mit 1 cc Pikratlösung (5 g Pikrinsäure + 27,5 g wasserfreies Natriumcarbonat in 1 Liter Wasser) versetzt, geschüttelt und dann 15 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die entstandene Farbe mit dem Standard verglichen. Zur Bereitung der Standardlösung wird eine Lösung von 1 mg Glucose pro Kubikzentimeter in derselben Weise behandelt (Tabelle I).

Tabelle I.

Zugesetzte Glucose in mg	Gefundene Glucose in mg	Zugesetzte Glucose in mg	Gefundene Glucose in mg
0,4	0,44	2,0	2,00
0,6	0,63	3,0	2,95
1,0	1,00	4,0	4,00
1,5	1,54	5,0	5,00

Wir haben weiter Versuche mit Fructose durchgeführt und gefunden, daß auch dieser Zucker nach dem obenerwähnten Verfahren bestimmt werden kann. Bei der Bestimmung von Saccharose werden 0,7 cc Zuckerlösung mit 0,1 cc 1 n HCl



10 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Neutralisieren mit 1 n NaOH unter Zusatz einer sehr geringen Menge 0,1 proz. Methylorange wird zur Lösung 1 cc Pikratlösung hinzugefügt und dann die Färbung gegen einen Standard colorimetriert. Die Standardlösung kann mit einer bekannten Menge reiner Saccharose in derselben Weise bereitet werden. Bei der Zuckermenge über 6 mg müssen 2 cc Pikratlösung zugesetzt werden.

Rohrzucker wird aber auch durch Erhitzen mit Pikratlösung allein etwas invertiert. Wenn daher die zu untersuchende Lösung Saccharose enthält, so ist stets eine Korrektur notwendig. Unter den oben beschriebenen Bedingungen entstehen durchschnittlich aus 1 g Rohrzucker 0,22 mg Invertzucker (Tabelle II).

Tabelle II.

Zugesetzter Rohrzucker in g	1,0	0,5	0,2
Entstandener Invertzucker in mg	0,20	0,10	0,05

Wenn man zu einer Natriumpikratlösung Mercurichlorid hinzufügt, so entsteht ein rotbrauner Niederschlag. Diese Substanz ist daher als antiseptisches Mittel der Zuckerlösung ungeeignet. Die Versuchsergebnisse über den Effekt einiger Reagenzien auf die Färbung durch Zucker und Pikrinsäure sind in Tabelle III wiedergegeben.

Tabelle III.

	Farbenintensität		Farbenintensität		Farbenintensität
Ohne Zusatz	100	0,2 g $\text{Na}_2\text{CO}_3$	125	0,01 g $\text{HgI}_2$	93
0,1 g NaCl	100	0,1 g $\text{Na}_2\text{CO}_3$	115	0,005 g $\text{HgI}_2$	100
0,05 g NaCl	100	0,05 g $\text{Na}_2\text{CO}_3$	103	0,002 g $\text{HgI}_2$	100

Die mit Zucker und Pikrat hergestellte Standardlösung entfärbt sich allmählich. Nach zahlreichen Vorversuchen konnten wir eine Reihe von haltbaren Standardlösungen bereiten (Tabelle IV).

Tabelle IV.

Glucose in mg	g in 10 cc Wasser		Glucose in mg	g in 10 cc Wasser	
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$		$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$
0,1	0	0,016	1,0	2,00	0,400
0,2	0	0,080	1,5	3,00	0,200
0,4	0	0,560	2,0	3,92	0,016
0,6	1,00	0,200			

## 2. UEBER DAS VERHALTEN DER ZUCKER IM ZUCKERROHR.

Zur Bestimmung der reduzierenden Zucker im Zuckerrohrsaft wird 0,1 cc Saft mit 0,9 cc Wasser und 1 cc Pikratlösung versetzt. Bei der Saccharosebestimmung

wird zu 0,02 cc Saft 0,5 cc Wasser zugesetzt und die Mischung in der oben-erwähnten Weise mit Salzsäure invertiert. Die Versuche in Tabelle V dienen als Belege für die Verwendbarkeit dieser Methode zur Zuckerbestimmung im Zuckerrohrsaft.

Tabelle V.

Rohrzucker in %		Reduzierender Zucker in %	
Polarisations Methode	Pikrinsäure Methode	Jod Methode	Pikrinsäure-methode
20,01	20,20	0,52	0,55

Wir haben nun die Veränderungen des Zuckergehaltes des Zuckerrohrsaftes im Laufe des Wachstums des Rohrs mit Hilfe dieser Methode untersucht. Als Untersuchungsmaterial wurden zunächst die im September gepflanzten Rohre verwendet (Tabellen VI bis XIV).

Tabelle VI.

F 108. 8 Monate altes Rohr.

Gezählt von unten	Länge des Zwischenknotens in cm	Grade Brix	Rohrzucker in %	Reduzierender Zucker in %	Rohrzucker Red, Zucker
1. Zwischenknoten	8,5	11,5	5,0	4,25	1,175
2. "	7,5	8,0	0,7	4,80	0,145
3. "	9,0	5,7	0,3	3,85	0,078
4. "	10,0	6,0	0,2	3,85	0,052

Tabelle VII.

F 108. 9 Monate altes Rohr.

Gezählt von unten	Länge des Zwischenknotens in cm	Grade Brix	Rohrzucker in %	Reduzierender Zucker in %	Rohrzucker Red, Zucker
1. Zwischenknoten	9	12,6	6,2	3,25	1,91
3. "	14	8,8	3,5	3,90	0,90
5. "	13	5,7	0,5	3,55	0,15
7. "	7	—	—	—	—

Tabelle VIII.

F 108. 10 Monate altes Rohr.

Gezählt von unten	Länge des Zwischenknotens in cm	Grade Brix	Rohrzucker in %	Reduzierender Zucker in %	Rohrzucker Red, Zucker
1. Zwischenknoten	10,5	14,2	12,5	2,25	5,56
3. "	11,0	14,2	10,1	3,70	2,73
5. "	16,0	12,3	8,0	4,10	1,96
7. "	14,5	8,5	3,3	4,35	0,80
9. "	13,5	6,2	0,9	5,10	0,18
11. "	14,5	5,0	0,5	4,30	0,12



Tabelle IX.  
F 108. 11 Monate altes Rohr.

Gezählt von unten	Länge des Zwischenknotens in cm	Grade Brix	Rohrzucker in %	Reduzierender Zucker in %	Rohrzucker Red. Zucker
1. Zwischenknoten	6,0	16,1	14,0	1,62	8,64
4. "	11,5	16,2	11,4	3,03	3,76
7. "	12,0	12,0	6,0	5,37	1,11
10. "	13,5	11,8	4,5	6,26	0,72
14. "	10,0	7,3	0,5	5,88	0,09

Tabelle X.  
F 108. 13 Monate altes Rohr.

Gezählt von unten	Länge des Zwischenknotens in cm	Grade Brix	Rohrzucker in %	Reduzierender Zucker in %	Rohrzucker Red. Zucker
1. Zwischenknoten	11,0	19,9	17,8	0,95	18,74
4. "	12,5	19,0	14,6	2,00	7,30
7. "	14,0	15,7	12,0	2,50	4,80
10. "	9,0	16,3	12,0	3,20	3,75
13. "	9,5	11,7	6,0	6,00	1,46
16. "	9,0	—	—	—	—

Tabelle XI.  
F 108. 15 Monate altes Rohr.

Gezählt von unten	Länge des Zwischenknotens in cm	Grade Brix	Rohrzucker in %	Reduzierender Zucker in %	Rohrzucker Red. Zucker
1. Zwischenknoten	12,0	21,1	19,0	1,15	16,52
5. "	13,5	20,3	18,0	1,25	14,40
10. "	15,0	19,3	16,5	1,90	8,68
15. "	10,0	19,9	17,0	1,50	11,33
21. "	3,0	17,3	15,0	1,50	10,00

Tabelle XII.  
F 108. 16 Monate altes Rohr.

Gezählt von unten	Länge des Zwischenknotens in cm	Grade Brix	Rohrzucker in %	Reduzierender Zucker in %	Rohrzucker Red. Zucker
1. Zwischenknoten	14,0	19,8	18,0	1,00	18,00
5. "	15,0	18,5	15,0	3,00	6,00
10. "	14,5	19,1	16,0	2,30	6,96
15. "	12,0	18,5	16,0	1,40	29,17
23. "	4,5	17,1	14,0	2,00	7,00

Tabelle XIII.  
F 108. 17 Monate altes Rohr.

Gezählt von unten	Länge des Zwischenknotens in cm	Grade Brix	Rohrzucker in %	Reduzierender Zucker in %	Rohrzucker Red. Zucker
1. Zwischenknoten	17,0	19,5	17,0	1,30	13,07
5. "	16,0	20,0	18,0	1,25	14,40
10. "	12,0	20,7	19,0	0,90	21,11
15. "	11,0	22,4	20,5	0,90	20,50
20. "	5,5	23,0	22,0	0,10	220,00

Tabelle XIV.  
F 108. 18 Monate altes Rohr.

Gezählt von unten	Länge des Zwischenknotens in cm	Grade Brix	Rohrzucker in %	Reduzierender Zucker in %	Rohrzucker Red. Zucker
1. Zwischenknoten	15,5	21,6	20,5	0,10	205,0
5. "	17,5	22,5	21,5	0,20	215,0
10. "	3,0	23,0	22,0	0,10	220,0
15. "	7,0	24,1	23,0	0,05	460,0
21. "	4,0	20,4	19,5	0,05	390,0

Die oben angeführten Daten sind einige Auszüge aus unseren zahlreichen eingehenden Versuchen. Im allgemeinen werden das spezifische Gewicht und der Saccharosegehalt des Saftes mit dem Wachstum des Zuckerrohrs größer. Die Menge des reduzierenden Zuckers im Saft hingegen vermindert sich allmählich. Der Rohrzuckergehalt ist im oberen Teil eines Stengels geringer als im unteren. Wir haben ähnliche Versuche mit F 113, 2725 POJ, 2883 POJ und 2778 POJ durchgeführt. Der Einfachheit halber werden in den Tabellen XV bis XVIII nur die maximalen Werte zusammengefasst.

Tabelle XV.  
F 113.

Monate nach der Pflanzung	Länge eines Stengels in m	Gewicht eines Stengels in kg	Grade Brix des Saftes	Saccharosegehalt des Saftes in %	Rohrzucker Red. Zucker
8	0,4	0,23	10,8	4,7	1,16
9	0,8	0,42	12,7	6,5	2,45
10	1,5	0,78	10,9	6,7	2,33
11	1,8	1,53	14,7	11,5	4,51
12	2,2	1,55	17,6	15,0	10,34
13	2,5	2,05	18,9	16,0	9,70
14	2,1	1,70	17,5	15,8	19,75
15	2,2	1,80	19,3	17,5	21,87



16	3,4	2,40	19,2	17,0	20,00
17	2,7	1,90	22,2	20,5	215,00
18	2,9	2,10	20,9	19,5	190,00

Tabelle XVI.

2725 POJ.

Monate nach der Pflanzung	Länge eines Stengels in m	Gewicht eines Stengels in kg	Grade Brix des Saftes	Saccharosegehalt des Saftes in %	Rohrzucker Red. Zucker
8	0,4	0,25	8,0	0,6	0,10
10	0,5	1,45	11,5	8,0	2,62
12	1,6	1,47	16,3	11,9	4,76
14	2,4	1,75	18,1	15,0	6,12
16	2,7	1,50	21,5	20,5	205,00
18	2,5	2,00	24,0	23,0	195,00

Tabelle XVII.

2883 POJ.

Monate nach der Pflanzung	Länge eines Stengels in m	Gewicht eines Stengels in kg	Grade Brix des Saftes	Saccharosegehalt des Saftes in %	Rohrzucker Red. Zucker
8	0,4	0,28	12,5	5,4	1,40
10	1,4	1,08	10,7	3,0	0,41
12	1,4	1,34	14,7	10,2	2,68
14	1,9	1,75	17,5	15,1	7,55
16	3,3	1,70	17,8	15,5	10,33
18	2,5	1,80	21,0	20,0	97,50

Tabelle XVIII.

2778 POJ.

Monate nach der Pflanzung	Länge eines Stengels in m	Gewicht eines Stengels in kg	Grade Brix des Saftes	Saccharosegehalt des Saftes in %	Rohrzucker Red. Zucker
8	0,3	0,32	6,5	0,3	0,07
10	1,6	1,01	10,5	4,5	0,91
12	2,1	1,44	12,4	6,9	1,82
14	2,3	1,53	16,7	13,0	5,11
16	2,6	1,80	20,8	18,6	26,40
18	2,6	1,80	21,3	19,5	63,33

Auch bei F 113, 2725 POJ, 2883 POJ und 2778 POJ wurden die gleichen Veränderungen des Zuckers im Saft wie bei F 108 beobachtet. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß während der Reife das Verhältnis von Rohrzucker zum reduzierenden Zucker plötzlich zunimmt. Wir haben dann den Zucker im Saft aus

den einzelnen Zwischenknoten der im Februar gepflanzten Rohre bestimmt. Die Tabellen XIX bis XXIII enthalten nur die maximalen Werte der ausserordentlich zahlreichen Daten. Bei den im Februar gepflanzten Zuckerrohren ist im allgemeinen die Zunahme des spezifischen Gewichts und des Saccharosegehaltes des Saftes im Laufe des Wachstums des Stengels schneller als bei den im September gepflanzten Rohren.

Tabelle XIX.

F 108.

Monate nach der Pflanzung	Gewicht eines Stengels in kg	Knotenzahl eines Stengels	Grade Brix des Saftes	Saccharosegehalt des Saftes in %	Rohrzucker Red. Zucker
5	0,19	2	8,1	2,4	0,44
6	0,80	7	12,3	7,3	1,93
7	0,86	8	14,7	11,1	3,93
8	1,23	12	16,2	12,5	5,21
9	1,70	16	18,0	15,0	8,71
10	1,55	23	20,4	16,5	15,78
12	1,70	20	24,0	22,5	225,00
13	1,60	20	24,3	23,0	230,00

Tabelle XX.

F 113.

Monate nach der Pflanzung	Gewicht eines Stengels in kg	Knotenzahl eines Stengels	Grade Brix des Saftes	Saccharosegehalt des Saftes in %	Rohrzucker Red. Zucker
5	0,11	3	7,5	1,4	0,25
7	1,01	13	13,6	10,0	3,70
9	1,28	18	17,5	14,5	7,21
11	1,24	19	19,0	17,0	14,78
12	1,60	19	23,3	22,0	220,00

Tabelle XXI.

2725 POJ.

Monate nach der Pflanzung	Gewicht eines Stengels in kg	Knotenzahl eines Stengels	Grade Brix des Saftes	Saccharosegehalt des Saftes in %	Rohrzucker Red. Zucker
5	0,15	2	8,7	2,8	0,61
7	0,54	7	14,3	8,3	1,98
9	1,27	14	17,1	13,5	6,36
12	1,60	19	21,8	20,5	205,00
13	1,50	21	22,5	21,5	215,00



Tabelle XXII.

2883 POJ.

Monate nach der Pflanzung	Gewicht eines Stengels in kg	Knotenzahl eines Stengels	Grade Brix des Saftes	Saccharosegehalt des Saftes in %	Rohrzucker Red. Zucker
5	0,17	2	6,5	0,3	0,05
7	0,65	6	12,3	6,7	1,49
9	1,03	12	15,3	10,0	2,70
12	1,55	17	21,0	20,0	140,00

Tabelle XXIII.

2878 POJ.

Monate nach der Pflanzung	Gewicht eines Stengels in kg	Knotenzahl eines Stengels	Grade Brix des Saftes	Saccharosegehalt des Saftes in %	Rohrzucker Red. Zucker
5	0,13	2	6,4	0,5	0,09
7	0,69	8	12,1	7,0	1,40
9	1,29	14	15,6	10,5	2,92
12	1,80	20	21,2	19,5	216,66

## SCHRIFTTUM.

- (1) Schachkeldian; Chem. Zentr., 1929, I. 2907.



**ABSTRACTS**

from

**TRANSACTIONS published in JAPANESE**

(Pages refer to the Japanese originals of this volume unless otherwise noted.)

**Separation and Identification of Fatty Acids.**

(pp. 491~494)

By Y. INOUE, H. YUKAWA and H. KATSUMATA.

(Biochemical Laboratory, Department of Agriculture, Kyoto Imperial University;

Received May 17, 1941.)

**Part 4. Separation of Saturated and Unsaturated Fatty Acids.**

Although many methods have been already proposed for the separation of saturated and unsaturated fatty acids, the authors tried to separate those acids by taking advantage of the difference in solubility of hydroxamic acid derivatives. Directly from soya bean oil, whole fatty acids were changed to hydroxamic acids, as explained in previous reports, and the mixture of hydroxamic acids were treated at 0° with alcohol, ether, petroleum ether and carbon tetrachloride separately. Each solution was filtered in cold state through a tared filter paper. The amount of insoluble hydroxamic acids obtained from 22 g of the oil was about 2.7~3.0 g in each case. And no particular difference by solvents could be seen.

It was confirmed that the insoluble fraction mostly consisted of a mixture of saturated fatty acid derivatives and the filtrate was that of the unsaturated. The neutralization and iodine values of each fraction of free acids, which were recovered by heating with dil. alc. sulphuric acid, as reported before, were determined; for instance, the neutralization value, 203.45 and 191.56, and the iodine value, 12.97 and 149.57 respectively for the insoluble and soluble fractions, using ether as solvent. Therefore, it is concluded that the oil contains about 12.3~13.6% of saturated acids as glycerides and this hydroxamic acid method may be of use for the separation of saturated and unsaturated fatty acids.

**Part 5. Separation of Volatile and Non-volatile Fatty Acids.**

The authors recognized, as described in the previous paper (this Journal, **16**, 504, 1940.), that hydroxamic acid derivatives of fatty acids were increasingly soluble in alcohol and water as the numbers of carbon decreased. Consequently it may be considered that these properties of hydroxamic acids could be applied

for the separation of volatile and non-volatile fatty acids, while the separation is, as well known, usually carried out by steam distillation. The authors prepared hydroxamic acid mixture from ethyl esters of fatty acids of coconut oil, according to the authors' usual method. The alcoholic solution of the mixture was diluted with water to 15% alcohol content and after thorough agitating, allowed to settle at room temperature for some time. The insoluble part was separated and the filtrate was evaporated under reduced pressure. Both fractions were decomposed to free acids with dil. alcoholic sulphuric acid and their mean molecular weights were determined respectively by titration. The results were as follows :

No. of experiment	Mean M.W. of original fatty acids	Mean M.W. of insoluble frac.	Mean M.W. of soluble frac.
1	218.80	238.18	174.38
2	218.80	239.23	
3	215.56	249.01	141.27
4	215.56	238.89	
5	215.56	234.34	
6	203.67	215.24	140.93
7	203.67	221.98	
8	224.31	244.11	177.54
9	224.31	251.59	
10	224.31	254.89	
11	215.56	238.86	191.86

Compared to experiment No. 11 which denotes the figures obtained by applying the ordinary steam distillation method to the fatty acids of the same oil, the hydroxamic acid method can be satisfactorily used for the separation of volatile and non-volatile fatty acids, and at the same time for the determination of the Reichert-Meissl number.

### Study of the Insecticidal Principle in the Smoke Produced by Combusting Insect Powder. (Part IV).

(pp. 495~502)

By Makoto NAGASE.

(Agricultural Chemical Department, Taihoku Imperial University, Taiwan ;

Received May 16, 1941.)

I examined the insecticidal power of the neutral substances obtained from the smoke of pyrethrum, and found that the following two fractions were most effective. So I studied the composition of these fractions and reached the following results.



(1) Bp. 50~98°/10 mm (yield 131 g from 20 kg)

(2) Bp. above 100°/10 mm (yield 64 g from 20 kg)

Bp. 50~98°/10 mm;—

a) The fraction consisted almost entirely of etherial compound.

b) By the action of HJ, it was decomposed into benzyl alcohol and ethyl iodide.

c) The maximum absorptions were at 278  $\mu\mu$  and 266  $\mu\mu$  and was identical with benzyl-ethyl ether.

From these facts this fraction was decided to be benzyl ethyl ether.

Bp. above 100°/10 mm;—

For the purification of this fraction it was subjected to chromatographic analysis with aluminium oxide.

From the strongly adsorbed part a small amount of acetophenon was obtained, and from the main part, which was hardly adsorbed, heptacosane, ethyl acetate and methylester of furancarboxylic acid were obtained.

## Studies on Methionine and its Derivatives. (II).

On the Separation of Methionine from Crude Leucine.

(pp. 503~551)

By Yoshitaro TAKAYAMA and Yoshio TSUCHIYA.

(S. Suzuki and Co., Ltd.; Received May 17, 1941.)

Natural leucine usually contains at least 5% of methionine. In the present investigation, the authors intended to separate the methionine from crude natural leucine which is obtained from soybean protein-HCl-hydrolysate, in order to establish the common separation method of methionine. After many trials, we found some difference of solubility for concentrated hydrochloric acid between methionine and leucine, i. e., the former is more soluble than the latter.

Using this property the separation of methionine was made and the procedure was as follows:—

The crude leucine is dissolved in concentrated hydrochloric acid on heating, and the leucine-HCl crystallized out on cooling, is separated and the raw-material is again dissolved in the mother liquor. The second crops of leucine-HCl are separated as above.

Thus the methionine is gathered in the mother liquor. The third crops of leucine-HCl are separated by subsequent concentration of the mother liquor above obtained, or, if tyrosine is present as the concomitant, by applying the treatment with concentrated HCl to the mixture of methionine and leucine, which is obtained after tyrosine is separated by recrystallization of the free amino acid mixture from water. The remaining leucine is separated, if desired, from the mixture of the two amino acids by subsequent concentration of the mother liquor.

Thus, crude methionine, the content of which is usually 40~50%, is obtained from the last residue after HCl has been recovered from the mother liquor by neutralization and recrystallization.

In order to obtain pure methionine, two methods of separation were carried out, i. e., one, the precipitation method of the double salt of methionine and mercuric chloride, and the other, the fractional distillation method of methionine- and leucine-ester. The principle of these methods was as follows:—

(I) The crude methionine above obtained is dissolved in water and mercuric chloride solution is added to the solution. The double salt of methionine and  $\text{HgCl}_2$  is now precipitated. The salt is separated from the liquid (leucine fraction) by decantation, and is dissolved in  $\text{HCl}$ , and  $\text{HgCl}_2$  liberated is extracted with ether. The residual solution is neutralized with alkali, and the methionine crystallized out is purified by repeated recrystallization.

(II) The crude methionine is esterified with absolute alcohol and dried  $\text{HCl}$ , and the ester hydrochloride formed is partially neutralized by the addition of quantitative amount of Na-alcoholate. The mixture of methionine- and leucine-ester thus obtained is fractionated under reduced pressure. The results obtained are as follows:—

Fraction	Pressure (mm)	Temperature of oil bath	Temperature of vapour
First fraction	15	115°~125°	86°~90°
Second fraction	15	150°~160°	123°~126°

The first fraction is leucine-ester and the second one is methionine-ester.

The methionine ester thus obtained is decomposed by boiling with water, and the methionine crystallized out is purified by repeated recrystallization.

### Untersuchungen über die chemischen Bestandteile der Früchte von *Rhus semialata* Murr., insbesondere die salzig Schmeckenden.

(SS. 512~520)

Von H. UOTA und K. NISHIDA.

(Aus dem Forstchemischen Institut der Kaiserlichen Kyusyu-Universität;

Eingegangen am 30. 5. 1941.)

Nach flüchtiger Untersuchung der Früchte von *Rhus semialata* Murr. hatte A. Fuchino früher vermutet, dass ihr salziger Geschmack auf die sauren Calciumsalze der Äpfelsäure sowie der in geringer Menge beigemengten Weinsäure und Zitronensäure zurückzuführen sein dürfte.

Um dies näher zu erforschen, haben Verff. die Früchte aus Kasuya-Ensyurin



benutzt, die genügend reif waren und einen salzigen, etwas säuerlichen Geschmack hatten.

Da durch Vorprüfung das Vorhandensein von Gerbstoff, welcher hauptsächlich aus Gallotannin bestand, Gallussäure, Äpfelsäure, Weinsäure und Zitronensäure nachgewiesen wurde, von denen die drei letzteren sich darin wohl als anorganische Salze vorfanden, haben Verff. zunächst den fast getrockneten Wasserextrakt (B) mit absolutem Alkohol (A) extrahiert, um den Gerbstoff, die Gallussäure sowie die freien Säuren und ihre in Alkohol leicht löslichen Salze von den schwer löslichen Salzen zu trennen.

Beim Einengen und darauffolgenden Stehenlassen des Alkoholextraktes (A) schieden sich große Mengen Kristallnadeln aus, die nach dem Umkristallisieren aus heißem Wasser als schöne, farblose, seidenglänzende Nadeln von herbem säuerlichem Geschmack erhalten wurden, deren Smp. bei  $217^{\circ}$  lag. Durch identifizierende Reaktionen wurden sie als Gallussäure erkannt. Die Ausbeute betrug 0,3%.

Der von der Gallussäure befreite Anteil wurde in Wasser gelöst und dann mit Essigester wiederholt umgeschüttelt, um den Gerbstoff zu beseitigen. Zur Trennung der freien organischen Säuren wurde die wässrige Lösung mit Aether erschöpfend extrahiert, aber der Auszug belief sich nur auf eine Spur. Daraus kann man mit grosser Wahrscheinlichkeit schließen, dass in den Früchten keine freien Säuren vorhanden sein dürften.

Nach dem Entfärben und Einengen wurde die in Aether unlösliche wässrige Lösung mit Alkohol versetzt, wobei eine 0,3% entsprechende Menge farbloser Nadeln von säuerlich salzigem Geschmack ausschieden, die kein Kristallwasser enthielten und bei  $172\sim 173^{\circ}$  einmal unter Abscheidung des durch weiteres Erhitzen schwer schmelzbaren Kristalls schmolzen. Sie bestehen aus Äpfelsäure und 30,01%igen Aschen, darin befinden sich Al, Ca, Mg und K in folgendem Verhältnis:

Al	Ca	Mg	K
0,47%	0,44%	0,15%	98,94%

Aus diesen Ergebnissen wird klar, dass bei diesen Kristallen die freie Carboxylgruppe zur gebundenen im Verhältnis 2:1 anwesend sein muss, da die Aschen bei diesem Fall fast aus reinem  $K_2CO_3$  bestehen müssen, was sich nur bei Annahme des übersauren Kaliummalats, d. h. Dikaliumhexamalats von der Zusammensetzung  $2C_2H_3(OH)\left\{\begin{smallmatrix} COOK \\ COOH \end{smallmatrix}\right. + C_2H_3(OH)(COOH)_2$  oder  $C_2H_3(OH)(COOK)_2 + 2C_2H_3(OH)(COOH)_2$ , befriedigend annehmen läßt.

In Wirklichkeit wurde die Gerichtfertigkeit dieser Vermutung durch Bestimmung sowohl des in Sulfat übergeführten Aschengehalts als auch der freien Carboxylgruppe bestätigt.

	Aschen (%)	Sulfat (%)	COOH (%)
Gef.	30,01	37,40	36,71
Ber.	28,89	36,43	37,64

Der in absolutem Alkohol unlösliche Anteil (B) mit salzigem Geschmack wurde in Wasser gelöst und nach dem Entfärben und darauffolgendem Konzentrieren stehengelassen, dabei schied sich eine große Menge Kristalle aus, die sich durch Waschen mit kaltem Wasser in einen leicht löslichen und einen schwer löslichen Teil trennen liessen.

Der letztere lieferte durch Umkristallisieren aus Alkohol und Wasser farblose Nadeln oder Säulen, die mit dem vorläufig aus dem alkoholischen Auszug erhaltenen Dikaliumhexamalat identisch waren. Die Ausbeute betrug 0,43%.

Der in kaltem Wasser leicht lösliche Teil bildete eine sauer reagierende, weiße, amorphe Masse von salzigem Geschmack, die aus Äpfelsäure nebst geringen Mengen Weinsäure und Zitronensäure sowie aus K, Al, Ca, Mg und Spuren Fe bestand. Die Ausbeute machte 0,4% aus. Die Verhältnisse der Kationen in dem Aschenanteil sind wie folgt:

Al (enthält wenige Fe <sup>+++</sup> )	Ca	Mg	K
4,71%	0,72%	1,02%	93,54%

Die von den Kristallen getrennte Mutterlauge des Anteils (B) war auch sauer reagierend und schmeckte salzig. Um die in derselben als Salze vorhandenen Kationen zu prüfen, wurde sie nach dem Verkohlen mit verdünnter Salzsäure entzogen und darauf das so erhaltene Chlorid analysiert, dabei waren die sechs Kationen im folgenden Verhältnis vorhanden:

Al	Fe	Ca	Mg	K	Na
14,28%	0,68%	2,22%	0,54%	82,28%	Spur.

Es trifft wohl aber zu, dass man die Existenz des Natriumions nicht seinem Salz der Oxypolycarbonsäuren, vielmehr gewöhnlichen anorganischen Salzen zuschreibt, die sich im allgemeinen im Pflanzengewebe befinden.

Um die Menge der gesamten Säuren und der einzelnen festzustellen, haben Verff. hierauf 500 g Früchte mit kaltem Wasser extrahiert und nach dem Beseitigen von Gerbstoff und Gallussäure durch Umschütteln mit Essigester jede Säure nach G. Jörgensen sowie Albahary getrennt, wodurch 1,86 g saures K-Tartarat, 0,8 g Zitronensäure und 34,6 g Pb-Malat erhalten wurden, daraus folgt:

	Äpfelsäure	Weinsäure	Zitronensäure
Säuremenge (g)	11,8	1,48	0,8
Im lufttrockenen Material (%)	2,90	0,26	0,16
Im absol. getrockneten Material (%)	3,46	0,35	0,19
Der gesamten Säure (%)	83,81	10,51	5,68

Zur Bestimmung des Gehalts an organischen Salzen in den Früchten haben Verff. zunächst den durch Hauptpulver vom Gerbstoff befreiten Wasserextrakt mit Essigester quantitativ erschöpfend umgeschüttelt, bis im Auszug keine Gallussäure mehr nach der Youngschen Reaktion nachweisbar war, zum Trocknen gebracht, dann gewogen und die Gewichts Differenz, nach Abzug der Menge der aus dem Hauptpulver gelösten organischen Stoffe, die durch Kontrolle direkt ermittelt wurde,



als die annähernde Menge der organischen sauren Salze angesehen. Der Gehalt an Gerbstoff, Gallussäure und organischen Salzen war wie folgt:

Gerbstoffgehalt (%)					
Im Hei-swaßerextr.	Im lufttrock. Material		Im absol. trock. Material		
37,75	5,00		5,96		
Gerbstoff, Gallussäure und Salze					
	Kaltwasser- extrakt	Tannin	Gallus- säure	Salze	Aschen
Im Kaltwasserextrakt (%)	—	35,17	9,67	55,16	—
Im luftgetrocknen Material (%)	9,19	3,23	0,89	5,07	—
Im absol. trocknen Material (%)	10,96	3,85	1,06	6,05	—
In den Salzen (%)	—	—	—	—	29,28

Aus allen obigen Ergebnissen kann man schließen, daß der Geschmack der Früchte von *Rhus semialata* Murr. zum Teil auf Gerbstoff und Gallussäure, zum größten Teil aber auf den sauren Salzen des K, Al sowie Ca, Mg und Fe beruht, deren Gehalt im luftgetrockneten Material etwa 5% entspricht.

In den Früchten findet sich noch zu 7,78% Japanwachs-ähnliches Fett, das im absolut getrockneten Material zu 9,27% vorkommt, dessen Eigenschaften folgende sind:  $n_D^{26}$  1,6502; S.Z. 32,17; V.Z. 215,80; E.Z. 183,06; J.Z. 43,70.

## Functional Studies on Soil (XXVII~XXIX).

(pp. 521~526)

By Hideo MISU.

(Agricultural Experiment Station, Government General of Tyosen;  
Received May 13, 1941.)

## Biochemical Studies of "Bakanae" Fungus.

Part 8. Effect of Gibberellin on Soybean Malt.

(pp. 527~528)

By T. YABUTA, Y. SUMIKI, N. MURAYAMA,  
and K. SUZUKI.

(Tokyo Imperial University; Received June 23 1941.)

## **The Effect of Cold Storage upon Vitamin A Content of Whale Livers.**

(pp. 529~534)

By T. MORI and S. ASAKAWA.

(Tokyo Imperial University; Received June 9, 1941.)

---

## **On the Chemical Studies of the Bagasse Pulp. (5)**

(pp. 535~536)

By TETUTARO TADOKORO, Masao NISHIDA,  
and Keizo ITO.

(Hokkaido Imperial University; Received May 15, 1941.)

---

## **On the Oxidizing Enzymes in Tea Leaf. II.**

(pp. 537~543)

By Hideiti TORII.

(Imperial Tea Experiment Station; Received May 21, 1941.)

In this report, the relation between the content of enzyme and the quality of made tea is examined. And the variations of tannin and catechin during the fermentation of tea leaf are studied.

---

## **Studies on the Tannin of *Acasia confusa* Merrill. (II)**

(pp. 544~546)

By Minoru ISHII.

(Agricultural Chemical Department, Taihoku Imp. University, Taiwan;  
Received June 19, 1941.)

The author made some chemical researches on the tannin of *Acasia confusa* Merrill.

By the disintegration of the tannin with dilute sulphuric acid or concentrated soda solution, phloroglucine was obtained besides a large amount of phlobaphene.

Methyl and acetyl derivatives which were prepared according to the ordinary methods gave the analytical data in carbon, hydrogen, methoxyl or acetyl values identical with those of methyl- or acetyl-catechin.



As the oxidation product of methyl tannin, veratric acid was confirmed.

Molecular weight determinations were carried out according to the osmotic pressure method and evullioscopic method, and the results obtained were as follows:

Osmotic pressure method (in alcohol)=573, (in acetone)=650

Evullioscopic method (in alcohol)=1078

From these investigations it would seem that this tannin is probably constituted by the condensation of at least 2 or 4 molecules of catechin.

### Studies on Red Yeast. 1. *Sporobolomyces* nov. sp.

(Report 1) Morphology and Physiology of the yeast

*Spolobolomyces* nov. sp.

(547~552)

By Izue YAMASAKI and Seizi MORISITA.

(Agricultural Chemical Institute, Kyūshū Imperial University, Hukuoka;

Received June 21, 1941.)

According to the morphological and physiological studies, the yeast was found to belong to Genus *Sporobolomyces* Kluyver and van Niel<sup>(1)</sup>, the so-called "Image former yeast," but to coincide with none of the known species described by the above mentioned authors and also by Derx.<sup>(2)</sup>

So we describe the yeast provisionally as *Sporobolomyces* nov. sp.

(1) A. J. Kluyver and C. B. van Niel: Zentbl. f. Bakt. II Abt., Bd. 63, 1 (1925).

(2) H. G. Derx: Ann. Mycologici., Vol. 28, 1 (1930).

### Studies on the "P'u-hwang" Seed Oil.

(pp. 553~558)

By Yuiti SHINOZAKI and Sizuo TAKUMI.

(Central Laboratory, South Manchuria Railway Company, Dairen, Japan;

Received June 20, 1941.)

The authors have investigated the chemical constituents of the seed oil of "P'u-hwang" grown in Manchuria.

The results may be summarized as follows;

(1) The seeds contain 20.3% of crude fatty oil (ether extract).

(2) The crude oil has the following constants;

Ref. Ind. (at 25°C)	1.4740	Density (25°C/15°C)	0.9256
Sap. V.	193.96	R. M. V.	0.22
Acid. V.	19.1	Polenske V.	0.42
Iod. V.	130.8	Unsap.	3.64%



It belongs to the semi-drying oil.

(3) From the solid fatty acids, palmitic, stearic, and arachidonic acids have been identified.

(4) The unsaturated fatty acids seem to consist chiefly of oleic acid and linolic acid.

(5) From the unsaponifiable substances, we have obtained some saturated hydrocarbons containing pentakosan and a substance melting at 63°C.

As phytosterin, typhasterins (m. p. 134°C~137°C) have been isolated.

## On the Chemical Mechanisms of Enzymatic Hydrolysis of Oils and Fats. Part 1.

Splitting of Fatty Acid Residues from Natural Oils  
by Ricinus Lipase Action.

(pp. 559~565)

By Y. INOUE and G. SHINTANI.

(Biochemical Laboratory, Department of Agriculture, Kyoto Imperial University ;

Received June 19, 1941.)

It may be considered that the further clearing up of the chemical mechanisms of enzymatic hydrolysis and synthesis of fats and oils will contribute to a better understanding of their physiological meanings in living organisms. Although many reports have been already issued in respect to the hydrolysis in alkaline or acidic medium and also by enzymes, many fundamental questions still remain in doubt. In the present work the authors tried to explain which fatty acid in glycerides, longer or shorter chained, would be split first from natural oils or fats by the action of ricinus lipase and at the same time to make clear how the unsatura-

After some investigations were carried out on the activity of castor seed tion of fatty acids in glycerides might have a relation to the enzymatic hydrolysis of natural oils.

powder which had been previously treated with ether, the condition of experiments was defined as follows: 1 g of oil or fat and 50 mg of pretreated castor seed powder were mixed with 0.5 cc of 0.1 N acetic acid and 0.5 cc water, following the incubation at 36°C. The reaction mixture was extracted with ether and after neutralizing with alcoholic potash, free fatty acids were precipitated with calcium chloride. The calcium soap was filtered and washed with ether-alcohol mixture and finally free acids were recovered by the ordinary method. The filtrate was evaporated under vacuum and its acetyl value, saponification value and melting point were determined. And then these partially decomposed and undecomposed glyceride mixtures were saponified with alcoholic potash and free acids were collected to determine the neutralization and iodine values.



Coconut oil, olive oil, sesame oil and cotton seed oil were used as substrates. For instance, the following table shows the neutralization values of split and unsplit fatty acids of coconut oil in the course of the enzymatic hydrolysis.

Time (hours)	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	24.0
Split fatty acids	266.75	266.72	265.15	257.33	269.25	256.86	254.83	261.22	257.66
Unsplit fatty acids	283.50	280.31	278.84	282.27	284.30	287.01	281.18	287.53	285.92

This oil being characterized by containing both longer and shorter chained fatty acids, the results show that the higher fatty acids would react easier to the enzyme than the lower fatty acids.

The second table shows neutralization values, iodine values and approximate melting points of each split and unsplit fatty acids which were isolated at intervals from the reaction mixture of enzymatic hydrolysis of cotton seed oil.

Time (hours)	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	24.0
Acid value of substrate	28.66	30.91	52.23	76.38	98.06	115.59	123.44	140.84	181.22
Neutralization value, {split	194.26	201.19	200.12	199.92	201.68	198.64	209.18	199.18	201.08
{unsplit	210.30	199.21	198.84	208.75	203.06	195.32	201.38	189.08	212.84
Iodine value {split	24.82	25.11	27.55	27.44	28.95	29.19	37.96	37.80	64.24
{unsplit	77.61	83.15	88.73	96.82	96.93	96.16	89.41	101.40	103.54
Approx. melting pt. {split	61.0°						52.0°	50.5°	50.0°
{unsplit	39.0°						32.0°	28.0°	25.5°

No appreciable difference was found in the figures of neutralization values which should be due to the poor content of volatile acids in cotton seed oil, whereas saturated acids were confirmed to have more tendency to be split from glycerides than the unsaturated.

### Glutathione Content of Liver.

(Lubus dexter, Lubus sinister, Lubus anterior, Lubus posterior,  
Lubus papiliformis, Lubus caudatus).

(pp. 566~568)

By Masayoshi OGAWA and Yutaka SETO.

(Department of Nutrition, College of Medicine, Nippon University;

Received June 19, 1941.)

# On the Metabolism of Organic Acids by Bacteria. III.

(pp. 569~577)

By S. TADA.

(Agricultural Chemical Laboratory, Tokyo Imperial University ;

Received June 12, 1941.)

## Studies on Bios. Part III.

Synthesis of Na-*dl*-Pantothenate.

(pp. 578~580)

By Nobusada OKORI and Tomozi EGAWA.

(Agricultural Chemical Laboratory, Faculty of Agriculture, Tokyo Imperial University ;

Received June 21 1941.)